

SEE CORRESPONDING REF. U.S. 5,171,678



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 394 111  
A1

⑫

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

㉑ Numéro de dépôt: 90401020.4

㉑ Int. Cl. 5: C07K 5/06, C07F 9/10

㉒ Date de dépôt: 13.04.90

㉓ Priorité: 17.04.89 FR 8905037

㉔ Inventeur: Behr, Jean-Paul

7 rue Eugénie

F-67100 Strasbourg(FR)

Inventeur: Loeffler, Jean-Philippe

10 rue Fritz Kiener

F-67000 Strasbourg(FR)

㉔ Date de publication de la demande:

24.10.90 Bulletin 90/43

㉔ Etats contractants désignés:

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

㉕ Demandeur: CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

15, Quai Anatole France

F-75700 Paris Cedex 07(FR)

㉖ Mandataire: Pilard, Jacques et al  
RHONE-POULENC SANTE, Service Brevets,

20 Avenue Raymond Aron

F-92165 Antony Cédex(FR)

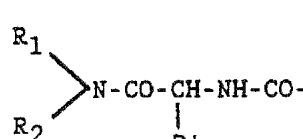
㉗ Nouvelles lipopolyamines, leur préparation et leur emploi.

㉘ Nouvelles lipopolyamines de formule générale (I), leurs sels, leur préparation et leur emploi.

$\text{H}_2\text{N} \left( \begin{array}{c} \text{C} \text{---} \text{H} \\ | \\ \text{R} \end{array} \right)_m \text{NH} \right)_n \text{H}$  (I)

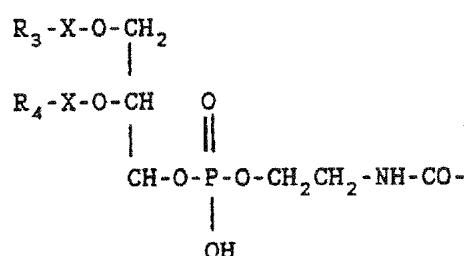
n = 1 à 5 et m = 2 à 6

R représente un radical



(R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> : radical aliphatique contenant 12 à 22 atomes de carbone ;

R : atome d'hydrogène ou radical alkyle éventuellement substitué par phényle), ou un radical



EP 0 394 111 A1

(X = CH<sub>2</sub>, CO ; R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> radical aliphatique contenant 11 à 21 atomes de carbone), leur préparation et leur emploi.

**EP 0 394 111 A1**

Les lipopolyamines de formule générale (I) sont particulièrement utiles comme vecteurs de transfection de cellules eucaryotes.

## NOUVELLES LIPOPOLYAMINES, LEUR PREPARATION ET LEUR EMPLOI

La présente invention concerne de nouvelles lipopolyamines de formule générale :  
 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})_{m-1}-\text{NH}_n-\text{H}$  (I)

sous forme D, L ou DL, leurs sels, leur préparation et leur emploi.

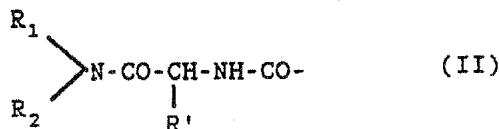
5 Dans la formule générale (I),

- n est un nombre entier compris entre 1 et 5 inclusivement,

- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement,

- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale:

10

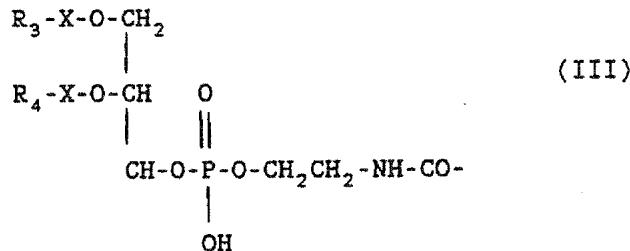


15

dans lequel  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$ , identiques ou différents, représentent chacun un radical aliphatique saturé  $\text{C}_p\text{H}_{2p+2}$  ou insaturé  $\text{C}_p\text{H}_{2p}$  ou  $\text{C}_p\text{H}_{2p-2}$ , p étant un nombre entier compris entre 12 et 22 inclusivement, et  $\text{R}'$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, ou un radical de formule générale :

20

25



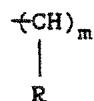
30

dans lequel X représente un groupement méthylène ( $-\text{CH}_2-$ ) ou un groupement carbonyle ( $-\text{CO}-$ ), et  $\text{R}_3$  et  $\text{R}_4$ , identiques ou différents, représentent chacun un radical aliphatique saturé  $\text{C}_p'\text{H}_{2p'+2}$  ou insaturé  $\text{C}_p'\text{H}_{2p'}$  ou  $\text{C}_p'\text{H}_{2p'-2}$ , p étant un nombre entier compris entre 11 et 21 inclusivement, étant entendu que :

35 - quelles que soient les valeurs de m et n, un seul des symboles R représente un radical de formule générale (II) ou (III)

- lorsque n est compris entre 2 et 5, les valeurs de m dans les différents fragments

40



45

peuvent être identiques ou différentes.

D'un intérêt tout particulier sont les produits de formule générale (I) dans laquelle n est égal à 3 et les valeurs de m dans les fragments

50



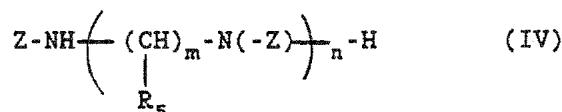
sont identiques ou différentes et représentent 3 ou 4, et R représente :

soit un radical de formule générale (II) dans lequel R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un radical alkyle contenant 12 à 22 atomes de carbone et R' représente un atome d'hydrogène,  
soit un radical de formule générale (III) dans lequel R<sub>3</sub>-X- et R<sub>4</sub>-X-représentent chacun un radical alcanoyle contenant 12 à 22 atomes de carbone.

5 Plus particulièrement intéressants encore sont la 5-carboxyspermylglycine dioctadécylamide (DOGS) et 5-carboxyspermylamine de la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPE).

Selon l'invention, les nouvelles lipopolyamines de formule générale (I) peuvent être obtenues par action sur un produit de formule générale :

10



15

dans laquelle m et n sont définis comme précédemment, R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical carboxy et les symboles Z représentent un groupement protecteur de la fonction amine, étant entendu que :

- quelles que soient les valeurs de m et n, un seul des symboles R<sub>5</sub> représente un radical carboxy
- lorsque n est compris entre 2 et 5, les valeurs de m des différents fragments

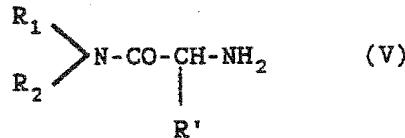
20

25



peuvent être identiques ou différentes  
soit d'un produit de formule générale :

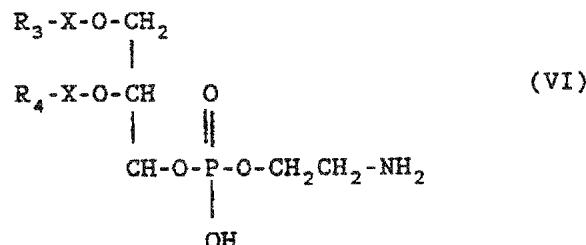
30



35

dans laquelle R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R' sont définis comme précédemment,  
soit d'un produit de formule générale :

40



50

dans laquelle R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et X sont définis comme précédemment, suivie du remplacement des groupements protecteurs Z par un atome d'hydrogène.

Lorsque l'on fait réagir un produit de formule générale (V) sur un produit de formule générale (IV), il est particulièrement avantageux d'effectuer la condensation en présence d'un diimide tel que le dicyclohexyl-carbodiimide en opérant dans un solvant organique inerte choisi parmi les solvants aliphatiques halogénés tels que le chlorure de méthylène.

Lorsque l'on fait réagir un produit de formule générale (VI) sur un produit de formule générale (IV), il est particulièrement avantageux de traiter préalablement la fonction acide du produit de formule générale (IV)

par le N-hydroxysuccinimide en opérant dans un solvant organique choisi parmi les hydrocarbures aliphatiques halogénés (chlorure de méthylène) et les éthers (tétrahydrofurane) en présence d'un imide tel que le dicyclohexylcarbodiimide, avant d'effectuer la condensation du produit de formule générale (VI). La condensation de l'ester mixte sur le produit de formule générale (VI) s'effectue généralement dans un 5 solvant organique (chloroforme, éthanol) en présence d'une base organique telle que la triéthylamine à une température comprise entre 30 et 50 ° C.

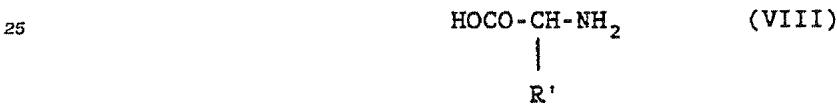
Généralement, on utilise un groupement protecteur Z qui est facilement remplaçable par un atome d'hydrogène sans toucher au reste de la molécule. Il est particulièrement avantageux d'utiliser comme groupement protecteur le radical t.butoxycarbonyle qui est facilement remplaçable par un atome d'hydrogène 10 au moyen d'un acide (acide trifluoroacétique).

Les produits de formule générale (IV) dans laquelle n est supérieur à 1 peuvent être obtenus à partir de l'ornithine par cyanoalkylation suivie de réduction des fonctions nitriles en fonctions amines, puis protection des fonctions amines ainsi obtenues.

Les produits de formule générale (V) peuvent être obtenus par action d'une amine de formule générale 15 :



dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont définis comme précédemment, sur un aminoacide de formule générale :



30 dans laquelle R' est défini comme précédemment, dont la fonction amine est protégée et dont la fonction acide est activée. Il est particulièrement avantageux de protéger la fonction amine par un radical benzyloxycarbonyle qui est facilement remplaçable par un atome d'hydrogène par hydrogénolyse en présence d'un catalyseur tel que le palladium. Généralement, la fonction acide est activée par transformation en ester p.nitrophénylié.

35 Les produits de formule générale (VI) sont des produits connus qui sont facilement accessibles.

Les nouveaux produits de formule générale (I) présentent la propriété, dispersés dans l'eau, de former des nanoparticules unilamellaires, qui sont instables en milieu ionique, et qui s'associent fortement, par leur partie cationique, avec l'ADN plasmidique ou oligonucléotidique en le compactant et en le recouvrant d'une couche lipidique. En utilisant un excès de charges cationiques par rapport à l'acide nucléique, les 40 complexes lipide/ADN peuvent être adsorbés sur les membranes cellulaires facilitant ainsi la capture de l'ADN par les cellules.

Les produits de formule générale (I) constituent des vecteurs spécifiques, non toxiques, biodégradables et de grande efficacité pour réaliser la transfection de cellules eucaryotes (lignées cellulaires, cultures primaires).

45 Selon l'invention, la transfection est réalisée en mettant en contact une suspension de cellules en absence de sérum avec un mélange transfectant obtenu, au moment de sa mise en oeuvre, à partir d'une solution de la lipopolyamine de formule générale (I) et d'une solution de l'ADN dans un milieu convenable.

Il est particulièrement avantageux d'opérer en milieu très dilué (1 à 5 nanomolaire) et d'utiliser un excès (de 2 à 5 fois) de charges de la lipopolyamine par rapport à l'ADN.

50 La durée de la transfection peut être comprise entre 10 minutes et 48 heures indépendamment de la nature des cellules.

Le procédé selon l'invention présente l'avantage de pouvoir s'appliquer à des lignées cellulaires d'origines diverses (incluant par exemple LMKT, Ras4, CHO, F9, Bu4, S49, Hela et AtT20) ainsi qu'à des cellules primaires sans qu'il soit nécessaire d'optimiser ou de modifier les conditions de mise en oeuvre du 55 procédé.

Par ailleurs, les lipopolyamines de formule générale (I) permettent de transfecter des cellules fragiles (cellules hypophysaires intermédiaires ou antérieures, cellules chromaffin, neurones périphériques ou centraux) qu'il n'était pas possible de transfecter par application de méthodes classiques (coprécipitation au

phosphate de calcium ou les techniques au dextrane).

Enfin, les agents de transfection selon l'invention ne manifestent pas de toxicité vis-à-vis des cellules transfectées. Ils ne manifestent pas de toxicité aiguë chez le rat après injection intracérébrale ou systémique.

5 La présente invention a pour objet également une solution alcoolique ou aqueuse stable d'une lipopolyamine de formule générale (I) utilisable pour la réalisation de transfections cellulaires.

Généralement, on prépare des solutions à 1 mg/ml qui permettent la réalisation d'environ 50 transfections.

10 Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut être mise en pratique.

#### EXEMPLE 1

15 On agite pendant 12 heures un mélange de L-5-carboxy-tétra-t.butoxycarbonylspermine (1 équivalent) et de glycine dioctadécylamide (1 équivalent) dans le chlorure de méthylène en présence de dicyclohexylcarbodiimide (1,1 équivalent).

Après chromatographie sur silice, on obtient, avec un rendement de 90 %, la tétra-t.butoxycarbonyl-5-carboxyspermylglycine dioctadécylamide dont les groupements protecteurs sont éliminés par traitement par 20 l'acide trifluoroacétique pendant 10 minutes à une température voisine de 20 °C. On obtient ainsi le tétratrifluoroacétate de 5-carboxyspermylglycine dioctadécylamide (DOGS).

25 La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire du proton à 200 MHz dans le méthanol deutéré (déplacements chimiques  $\delta$  en ppm) : 0,9 [t,  $(\text{CH}_3)_2$ ] ; 1,3 [m, 2 x  $(\text{CH}_2)_{15}$ ] ; 1,4-1,7 (m, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$ ) ; 1,8-2,2 (m, 4 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ ) ; 3,0-3,2 (m, 5 x  $\text{CH}_2\text{N}^+$ ) ; 3,35 (t, 2 x  $\text{CH}_2\text{NCO}$ ) ; 4,0 (t,  $\text{CHN}^+$ ) ; 4,15 (s,  $\text{COCH}_2\text{ND}$ ).

La L-5-carboxy-tétra-t.butoxycarbonylspermine peut être préparée de la manière suivante :  
A une solution 1M de L-ornithine dans le diméthylformamide, on ajoute 2,2 équivalents d'acrylonitrile. On agite pendant 1 heure à une température voisine de 20 °C.

30 Le dinitrile ainsi obtenu est réduit par l'hydrogène en présence de nickel de Raney en opérant en présence de potasse éthanolique pour donner la L-5-carboxyspermine dont les fonctions amines sont protégées par des groupements t.butoxycarbonyle par application des méthodes habituelles.

35 La glycinedioctadécylamide peut être préparé par condensation de dioctadécylamine (1 équivalent) avec l'ester p.nitrophényle de la N-carbobenzoxy-glycine (1 équivalent) en opérant dans le chlorure de méthylène en présence de triéthylamine (1,1 équivalent) pendant 5 heures.

Après hydrogénéation pendant 1 heure en présence de palladium sur noir à 10 % en opérant dans un mélange chlorure de méthylène-éthanol, on obtient la glycinedioctadécylamide avec un rendement de 87 %.

#### EXEMPLE 2

On traite pendant 12 heures la L-5-carboxy-tétra-t.butoxycarbonylspermine (1 équivalent) par la N-hydroxysuccinimide (1,1 équivalent) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (1,1 équivalent) en opérant dans un mélange chlorure de méthylène-tétrahydrofurane.

45 L'ester obtenu est traité par la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (1 équivalent) en présence de triéthylamine (1 équivalent) dans un mélange chloroforme-éthanol pendant 12 heures à 40 °C. Après traitement du mélange réactionnel, on obtient, avec un rendement de 55 %, la tétra-t.butoxycarbonyl-5-carboxyspermylamide de la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine dont les groupements protecteurs sont éliminés par l'acide trifluoroacétique dans le chlorure de méthylène. On obtient ainsi la 5-carboxyspermylamide de la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPEs) sous forme de tétratrifluoroacétate.

50 La structure du produit obtenu est confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire du proton à 200 MHz dans le mélange chloroforme deutéré-méthanol deutéré (1-1 en volumes) (déplacements chimiques  $\delta$  en ppm) : 0,85 [t,  $(\text{CH}_3)_2$ ] ; [m, 2 x  $(\text{CH}_2)_{12}$ ] ; 1,5-1,65 (m, 2 x  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ) ; 1,8-2,1 (m, 4 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ ) ; 2,3 (tt, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$ ) ; 2,9-3,1 (m, 5 x  $\text{CH}_2\text{N}^+$ ) ; 3,2 (bm,  $\text{CH}_2\text{NDCO}$ ) ; 3,75-4,05 (m,  $\text{CHN}^+$ , 2 x  $\text{CH}_2\text{OP}$ ) ; 4,15-4,40 (2 x dd,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ) ; 5,20 (OCH).

#### EXEMPLE 3

Une solution 20mM de DOGS dans l'éthanol est diluée 10 fois par de l'eau stérile de façon à obtenir une solution 2mM. On prélève 7,5  $\mu\text{l}$  de cette solution que l'on dilue dans 250  $\mu\text{l}$  de milieu DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium).

On prépare une solution contenant 5  $\mu\text{g}$  de plasmide contenant un vecteur d'expression de la chloramphénicol acétyl transférase CAT (par exemple une construction dérivée du plasmide pCAT 8+ [L. Klein-Hitpass et coll., Cell, 46, 1053-1061 (1986)] par insertion d'un fragment (BamHI-XbaI) contenant 4 copies de la séquence AP1 ["binding consensus sequence" (pCAT 4XB)] dans 250  $\mu\text{l}$  de milieu DMEM.

On prépare une suspension de  $10^5$ - $10^6$  cellules mélanotropes [préparées selon B.A. Demeineix et coll., Neuroscience, 17, 1275-1285 (1986)] dans 500  $\mu\text{l}$  de milieu DMEM en l'absence de sérum.

Les solutions de DOGS et de plasmide sont mélangées et le mélange "transfектant" est ajouté à la suspension de cellules.

Le mélange est incubé à 37 °C pendant une période déterminée.

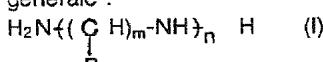
Après transfection, les cellules sont lavées deux fois puis étaillées. Après 48 heures, les cellules sont lavées par un tampon phosphate (PBS) puis on détermine l'activité chloramphénicol acétyl transférase selon la méthode de C.M. Gorman et coll., Mol. Cell. Biol., 2, 1044-1051 (1982).

Les cellules sont remises en suspension dans 100  $\mu\text{l}$  d'une solution 200mM de TRIS-HCl (pH = 7,4). Après plusieurs cycles de refroidissement-réchauffement, 50  $\mu\text{l}$  du surnageant sont ajoutés à 40  $\mu\text{l}$  de TRIS-HCl (pH = 7,4) contenant du chloramphénicol marqué au  $^{14}\text{C}$  (0,1  $\mu\text{Ci}$ ). Après 5 minutes à 37 °C, la réaction est initiée par addition de 20  $\mu\text{l}$  d'acétyl CoA (4mM). Après 1 heure à 37 °C, le chloramphénicol et ses dérivés acétylés sont extraits à l'acétate d'éthyle, séparés par chromatographie en couche mince et autoradiographiés. Les autoradiogrammes sont analysés par une méthode appropriée.

Cette méthode permet ainsi l'analyse de différents promoteurs dans les cultures primaires en général.

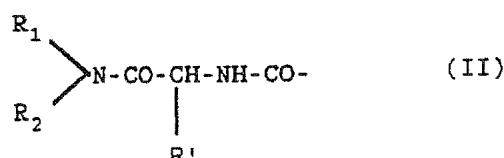
## 25 Revendications

1 - Nouvelle lipopolyamine sous forme D, L ou DL caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale :



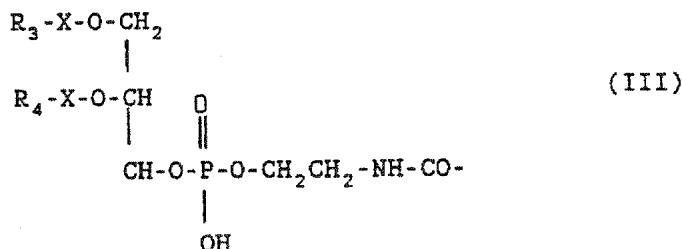
dans laquelle :

- n est un nombre entier compris entre 1 et 5 inclusivement,
- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale:



40

dans lequel  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$ , identiques ou différents, représentent chacun un radical aliphatique saturé  $\text{C}_p\text{H}_{2p+2}$  ou insaturé  $\text{C}_p\text{H}_{2p}$  ou  $\text{C}_p\text{H}_{2p-2}$ , p étant un nombre entier compris entre 12 et 22 inclusivement, et  $\text{R}'$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, ou un radical de formule générale :



55

dans laquelle X représente un groupement méthylène ou un groupement carbonyle et  $\text{R}_3$  et  $\text{R}_4$ , identiques

ou différents, représentent chacun un radical aliphatique saturé  $C_p'H_{2p'} + 2$  ou insaturé  $C_p'H_{2p'}$  ou  $C_p'H_{2p'} - 2$ ,  $p'$  étant un nombre entier compris entre 11 et 21 inclusivement, étant entendu que :

- quelles que soient les valeurs de  $m$  et  $n$ , un seul des symboles  $R$  représente un radical de formule générale (II) ou (III)

- 5 - lorsque  $n$  est compris entre 2 et 5, les valeurs de  $m$  dans les différents fragments

10



peuvent être identiques ou différentes,  
ainsi que ses sels.

- 15 2 - Nouvelle lipopolyamine selon la revendication 1 caractérisée en ce que  $n$  est égal à 3 et les valeurs de  $m$  dans les fragments

20



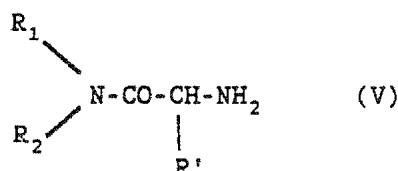
sont identiques ou différentes et représentent 3 ou 4 et  $R$  représente soit un radical de formule générale (II),  
25 dans lequel  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un radical alkyle contenant 11 à 22 atomes de carbone et  $R$  représente un atome d'hydrogène soit un radical de formule générale (III) dans lequel  $R_3-X-$  et  $R_4-X-$  représentent chacun un radical alcanoyle contenant 12 à 22 atomes de carbone, et ses sels.

3 - La 5-carboxyspermylglycine dioctadécylamide.

4 - La 5-carboxyspermylamide de la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine.

- 30 5 - Procédé de préparation d'une lipopolyamine selon la revendication 1 pour laquelle  $R$  représente un radical de formule générale (II) caractérisé en ce que l'on fait agir un produit de formule générale :

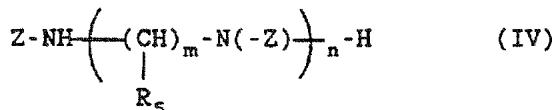
35



40

dans laquelle  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R'$  sont définis comme dans la revendication 1, sur un produit de formule générale :

45



dans laquelle  $m$  et  $n$  sont définis comme dans la revendication 1,  $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un radical carboxy et les symboles  $Z$  représentent un groupement protecteur de la fonction amine, étant entendu que :

- 50 - quelles que soient les valeurs de  $m$  et  $n$ , un seul des symboles  $R_5$  représente un radical carboxy  
- lorsque  $n$  est compris entre 2 et 5, les valeurs de  $m$  des différents fragments

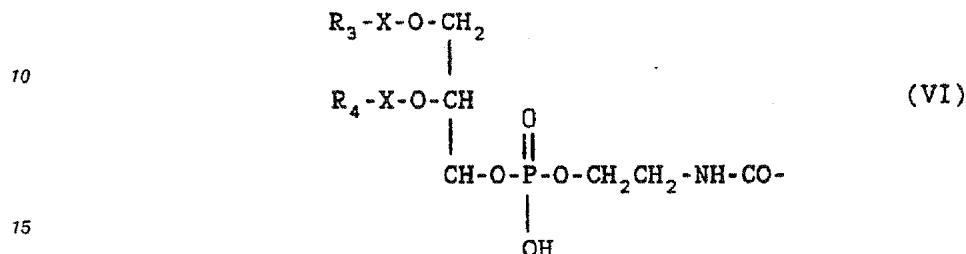
55



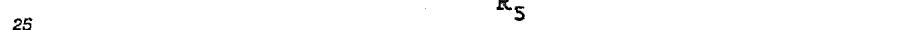
peuvent être identiques ou différentes,

en présence d'un diimide dans un solvant organique inerte choisi parmi les hydrocarbures aliphatiques halogénés, puis remplace les groupements protecteurs Z par un atome d'hydrogène, et isole le produit obtenu éventuellement sous forme de sel.

- 5 6 - Procédé de préparation d'une lipopolyamine selon la revendication 1 pour laquelle R représente un radical de formule générale (III) caractérisé en ce que l'on fait réagir un produit de formule générale :



20 dans laquelle  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  et X sont définis comme dans la revendication 1, avec un ester avec le N-hydroxysuccinimide du produit de formule générale :



25 dans laquelle m, n,  $\text{R}_5$  et Z sont définis comme dans la revendication 5 en opérant dans un solvant organique choisi parmi les hydrocarbures aliphatiques chlorés et les alcools en présence d'une base organique choisie parmi les amines tertiaires, puis remplace les groupements protecteurs Z par un atome d'hydrogène, et isole le produit obtenu éventuellement sous forme de sel.

30 7 - Utilisation d'une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 4 pour la transfection de cellules eucaryotes caractérisée en ce que l'on mélange dans un milieu convenable une solution aqueuse diluée d'un produit selon l'une des revendications 1 à 4 avec une solution aqueuse diluée de l'ADN plasmidique ou oligonucléotidique puis met en contact le mélange transfectant avec une suspension de cellules à transfacter.

35 8 - Utilisation selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'on transfecete des lignées cellulaires ou des cultures primaires.

9 - Une solution éthanolique d'un produit selon l'une des revendications 1 à 4 pour réaliser la transfection selon l'une des revendications 7 ou 8.

40 10 - Une solution aqueuse d'un produit selon l'une des revendications 1 à 4 pour réaliser la transfection selon l'une des revendications 7 ou 8.

45

50

55